

論文内容の要旨

申請者氏名 上田 洋二

DNA チップは、スライドガラスまたはシリコン基板上に DNA の部分配列を高密度に固定したものであり、多数の遺伝子発現情報を一括に解析できるツールとして、ゲノム関連の基礎研究に用いられてきた。本研究では、まず、DNA チップの検出感度・精度を向上させるために新たな DNA チップの開発を行った。ハイブリダイゼーションの反応性を向上させるため、柱状構造 DNA チップとハイブリダイゼーション溶液をビーズで攪拌する方法を検討し、攪拌しない場合に比べ、3 倍の感度増強効果がみられた。また、DNA チップ基板に黒色粒子を添加し、自家蛍光を低減させることで、バックグラウンドノイズによる検出ばらつきを抑えた。さらに、基板上に固定するプローブ DNA を、固定化効率の高い修飾基を持つもった新アミノ化オリゴ DNA を用いることで感度性能を向上させた。最終的に、これらの技術を組み合わせた高感度 DNA チップは、標識 RNA を 0.3amol/chip まで検出できることを示した。

次に、高感度 DNA チップの性能を生物材料を用いて評価するため、出芽酵母の高感度酵母チップを開発した。そして、転写因子の強制発現による誘導遺伝子探索モデルを用い、その性能を GeneChip と比較評価した。その結果、高感度酵母チップは、CeneChip に比べ、低シグナルスポットでのばらつきが少なく、多数の遺伝子を検出でき、より多数の変動遺伝子を検出できることを実証した。

そして、高感度酵母 DNA チップを活用したアプリケーションの開発を行った。出芽酵母の染色体を分断し、ミニ染色体を創出する PCS 法を応用し、様々なゲノム構成を持つ株を作出できる Genome Reorganization Technology(GReO)法を開発した。そして、複数のミニ染色体を持った細胞を栄養培地で培養することで、19 種の異なるゲノム構成を持った株を作出することができることを実証した。さらに、それらの株のゲノム構成を高感度酵母チップで調べたところ、ミニ染色体の脱落の検出に加え、ミニ染色体のコピー数増幅やミトコンドリア、rRNA 遺伝子のコピー数変化を検出でき、GReO 法はミニ染色体のコピー数変動だけでなく、その他のゲノム領域に対しても影響を与えることが示唆された。

さらに、高感度性能を生かし、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)試料中の RNA の解析を可能とする技術開発を行った。そのため、RNA 抽出方法を改良することで RNA の分解を低減し、さらに、RNA 増幅倍率を抑えることにより増幅バイアスを低減させた。本技術の有効性を検証するため、同一の臨床検体組織を凍結試料及び FFPE 試料にし、それぞれから抽出した RNA を用いて遺伝子発現解析を行った結果、凍結試料由来 RNA と FFPE 試料由来 RNA とで相関性の高い結果が得られ、肺腺がん組織に特徴的な遺伝子を抽出できることが分かった。また、同じ検体を用いてマイクロ RNA の解析を行ったところ、肺腺がんの既知のマーカである miR-21 を検出することができた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 上田 洋二

DNA チップは多数の遺伝子発現情報を一括に解析できるツールとして、ゲノム関連の基礎研究に用いられてきており、今後も、臨床現場等での実用ツールとしての活用が期待されている。申請者は、DNA チップ研究所及び東レ株式会社において、独自の高感度 DNA チップの開発とその活用に関する研究開発に従事してきた。本学位論文は、その間の研究に基づくものであり、以下のような研究成果を報告している。

1) 柱状構造 DNA チップ基板という独自の材料に着目し、ハイブリダイゼーション溶液のビーズ攪拌の導入、基板への黒色粒子の添加による自家蛍光の低減、固定化効率の高い修飾基を持つもった新アミノ化オリゴ DNA の利用という技術開発を行い、標識 RNA を 0.3amol/chip まで検出できる高感度 DNA チップを開発した。

2) 出芽酵母の全遺伝子について特異性と反応性を確保したプローブ配列を設計し、高感度酵母チップを開発した。そして、7種の転写因子の強制発現によって発現が誘導される遺伝子の解析を行い、DNA チップのスタンダードである GeneChip による結果と比較評価した。その結果、高感度酵母チップは、GeneChip に比べ多数の遺伝子の発現を検出できることを示し、さらに、7種の転写因子の制御下にあると考えられる多数の新規遺伝子を同定した。

3) 出芽酵母でミニ染色体を創出する PCS 法を応用し、様々なゲノム構成を持つ株を作出できる Genome Reorganization Technology(GReO)法を開発した。そして、30個のミニ染色体を持った細胞を栄養培地で培養することで、ミニ染色体を脱落させることにより 19種の異なるゲノム構成を持った株を作出した。興味深いことに、脱落したミニ染色体の組み合わせは限られており、未知の合成致死となる遺伝子の組み合わせが示唆された。さらに、それらの株のゲノム構成を高感度酵母チップで調べたところ、ミニ染色体のコピー数増幅やミトコンドリア、rRNA 遺伝子のコピー数変化が検出できた。今後、GReO 法と高感度酵母チップを組み合わせることで、ゲノム構成と細胞機能との関連について新たな知見を得ることが期待できる。

4) 高感度 DNA チップにより、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料中の RNA の解析を可能とするための技術開発を行った。その結果、さらなる改良が必要ではあるが、バイオマーカー探索や診断用途に高感度 DNA チップが活用できる可能性を示した。

以上のように、本論文は独自の高感度 DNA チップの開発とその基礎及び応用研究への活用を報告したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。また、申請者は博士学位にふさわしい研究遂行能力を修得していると判断された。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。